

DER ABLAUF DER UMWANDLUNG
VON PROTHROMBIN IN THROMBIN UNTER DEM
EINFLUSS VERSCHIEDENER FAKTOREN

WOLFGANG GLASER

Der Verfasser 2/1963

1963

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. Heinz)

"Der Ablauf der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin
unter dem Einfluss verschiedener Faktoren"

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe - Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Wolfgang Glaser
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 1963



Dekan: Prof. Dr. Krücke
Referent: Prof. Dr. L. Rôka
Korreferent: Prof. Dr. A. Wacker
Mündliche Prüfung: 13.3.1963

Dem Andenken meines verstorbenen Vaters,

Dr. med. dent. H. Glaser

in dankbarer Liebe gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

GLIEDERUNG

A. Einleitung

- 1.) Beurteilung der verschiedenen Variationen der experimentellen Umwandlung von Prothrombin in Thrombin
- 2.) Problemstellung dieser Arbeit

B. Hauptteil

1.) Versuchsbedingungen und Methodik

- a) Versuchsanordnung
- b) Ansätze
- c) Ausgangssubstanzen

2.) Ergebnisse

I. Problem: Lassen sich Ca^{++} -Ionen durch andere Ionen ersetzen?

- a) Optimale (Ca^{++}) - Konzentration
- b) Mn^{++} -Ionen
- c) Mg^{++} -, Sr^{++} -, Cs^{++} -, Na^{+} -, NH_4^{+} -Ionen

II. Problem: Zwischenprodukt

- a) Möglichkeiten
- b) Nachweis
- c) Befunde
- d) Abhängigkeit des Z.P. von
Vorbehandlung des PTB
Zusatz von SK
pH
Ionen

C. Besprechung und Zusammenfassung der gefundenen Ergebnisse

D. Literaturverzeichnis

A b k ü r z u n g e n

PTB	=	Prothrombin
TB	=	Thrombin
TK	=	Thrombokinas
F'gen	=	Fibrinogen
S.S.	=	Sammelserum
V	=	Faktor V
VII	=	Faktor VII
TCA	=	Trichloracetic Acid
ZP	=	Zwischenprodukt
T	=	Laufzeit des Versuches
GZ	=	t = Gerinnungszeit (sec.)

A. Einleitung

I. Beurteilung der verschiedenen Variationen der experimentellen Umwandlung von PTB in TB.

Für die Umwandlung von PTB in TB in vitro sind heute drei verschiedene Wege bekannt:

- 1.) In Gegenwart von PTB-Aktivator: PTB $\xrightarrow{\text{PTB-Aktivator}}$ TB
- 2.) In 25 % Citrat-Lösung: PTB $\xrightarrow{25\% \text{ Citrat}}$ TB
- 3.) In Anwesenheit von Trypsin: PTB $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ TB

Die zuerst angeführte Möglichkeit gibt den Ablauf bei der spontanen Blutgerinnung wider. Dabei wirken mehrere Komponenten aus Gewebe, Blutzellen, Plasma und Serum (z.B. Gewebe - TK + Ca⁺⁺ + Faktor V + Faktor VII) auf PTB, wobei in einer Reaktion 2. Ordnung unter Verbrauch des physiologischen Aktivators TB entsteht (Rôka) (1).

Unter der zweiten Bedingung wird PTB in 25 % Citrat-Lösung zu TB umgebaut, wobei nach Miller und Vunakis (2) bereits zu Beginn der Reaktion TB in katalytischer Menge vorhanden sein muss. Und zwar fand Seegers (3), dass während der autokatalytisch ablaufenden Reaktion das PTB-Molekül zu einem inaktiven, d.h. weder als PTB noch als TB nachweisbaren Zwischenprodukt umgewandelt wird, aus dem erst allmählich TB entsteht, denn der grösste Teil des zu Anfang vorhandenen PTB verschwindet

sehr rasch, längst bevor ein Anstieg an TB feststellbar ist. Diese "intermediate substance" mit einem - von Waugh und Laury nach Messungen mit der Ultrazentrifuge geschätzten - Molekulargewicht von ca. 45.000, gegenüber ca. 63.000 des PTB, soll die Aktivität von PTB erhöhen.

Die Umwandlung von PTB in TB zerfällt also in zwei Teilreaktionen:

1. PTB $\longrightarrow$ Zwischenprodukt + Bruchstücke

2. Zwischenprodukt $\longrightarrow$ TB,

wobei der erste Teil als Zersetzungs- und der zweite als Aktivierungsstufe bezeichnet werden kann, d.h. zuerst wird zugleich mit dem plötzlichen Verschwinden des PTB neben Bruchstücken (die u.a. Kohlehydrate und Tyrosin enthalten) eine Zwischensubstanz freigesetzt, aus der dann in der zweiten Etappe TB gebildet wird.

Die Bildung der Zwischensubstanz ist ausser auf chemischem Wege auch physikalisch mittels Ultrazentrifuge und Elektrophoresediagramm nachweisbar.

Die dritte Möglichkeit, PTB in Gegenwart von Trypsin in TB umzuwandeln, ist von Schultze und Schwick (4) und später von Rôka eingehend untersucht worden. Rôka hatte festgestellt, dass für die Reaktion (I) Ca^{++} -Ionen erforderlich sind. Ob auch bei diesem Umbauweg ein Zwischenprodukt auftritt, war nicht bekannt, ausserdem sollte die Frage untersucht werden, welche Rolle die Ionen bei dieser Reaktion spielen.

2. Problemstellung dieser Arbeit

Das sind die beiden Probleme, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen. Zunächst sollte geprüft werden, wie die TB-Bildung durch Änderung der (Ca)-Konzentration beeinflusst wird. Ausserdem wurde geprüft, wie sich die TB-Bildung ändert, wenn Ca^{++} -Ionen durch andere divalente und univalente Kationen ersetzt werden.

Danach sollte geprüft werden, ob die Abnahme von PTB auch nach Trypsinzusatz schon zu einem Zeitpunkt erfolgt, zu dem das gebildete TB noch nicht nachgewiesen werden kann.

B. H a u p t t e i l

I. _V_e_r_s_u_c_h_s_b_e_d_i_n_g_u_n_g_e_n_ _u_n_d_ _M_e_t_h_o_d_i_k

a) Versuchsanordnung

Das Wesentliche über die Versuchsbedingungen, die Ansätze und deren Ausgangssubstanzen sei vorangestellt: Das TB führt, wie wir aus dem komplizierten Mechanismus der Blutgerinnung wissen, zur Gerinnung des Fibrins aus seiner Vorstufe, dem Fibrinogen. Aus dem plötzlichen Sichtbarwerden von Fibrinfäden in einer Fibrinogenlösung in vitro können wir schliessen,

dass darin TB enthalten sein muss.

Ich benutzte bei meinen Versuchen Gerinnungsröhrchen von ca. 3 mm lichter Weite und ca. 6 cm Höhe, die in einem Ständer stehen, der wiederum in einem mit Wasser gefüllten kubischen Glasbecken von ca. 50 l Inhalt hängt. Mit Hilfe eines Röhrensystems, durch das Wasser eines auf 37° C eingestellten Thermostaten fließt, wird die Temperatur konstant gehalten. Die Versuche haben eine Laufzeit (=T) von meist 90, selten 120 Minuten. Bei T = 2,5', 5', 10', 15', 20', 30', 40', 50', 60' und 90' werden jeweils Proben von 0,2 ml des zu untersuchenden Ansatzes entnommen und in Gerinnungsröhrchen pipettiert, in die bereits je 0,1 ml F'gen vorgelegt wurde, und die im 37° C warmen Wasser für einige Minuten vorgewärmt sind. Darauf beginnt man sofort, aus Messingdraht von 1,0 cm Ø gebogene Haken einzutauchen und rhythmisch auf- und niederzubewegen, um eine Gerinnung zu provozieren. Die Gerinnungszeit (=GZ) wird in Doppelbestimmungen mit der Stoppuhr gemessen.

Die 300 mg % F'gen-Lösung, aus der der Gerinnungsablauf bewirkt wurde, wird während der gesamten Versuchszeit auf 12° C gehalten. Der Inkubationsansatz wird im Eisbad gehalten, sodass die Umsetzung von PTB durch Trypsin bei etwa 0° bis 2° C abläuft

Da es wegen der Vielzahl der zur Zeit T = 0' erforderlichen Handgriffe unmöglich ist, bereits einen exakten T = 0'-Wert

zu ermitteln, wurde die erste Messung erst bei $T = 2,5'$ durchgeführt.

b) Ansätze

Für die Experimente, die den Einfluss der Konzentration verschiedener Ionen klären sollten, wurde folgender Ansatz, mit dem jeweils wechselnden Ion in entsprechender Konzentration, gewählt (Beispiel):

inkubiert im Eisbad	{	PTB - Lösung	- 2,0 ml (gel.in aqua bidest.)	
		Titriplex - 4mM	- 0,5 " (" " " ")	
		Trypsin	- 10 ₈ /ml - 1,25 " (" " " ")	
		Ca-Cl ₂	- 12 mM	
		60 "		
		300 "	} jeweils 1,25 ml (gelöst in Trispuffer pH 8,0)	
		500 "		
		1.000 "		

Nach der jeweils angegebenen Zeit wurden Proben von je 0,2 ml mit aqua bidest. 1:5 verdünnt, davon 0,2 ml zu 0,1 ml F'gen gegeben. Das F'gen war in Trispuffer von pH 8,0 gelöst. Die Gerinnungszeit wird bei 37° C gemessen, daraus der TB-Gehalt errechnet.

Die 2. Aufgabe erfordert die Bestimmung von PTB und TB nebeneinander.

Zur rTB-Bestimmung wird eine Probe aus dem Inkubationsgemisch

(PTB + Trypsin + Kation) mit je 0,2 ml TK, SS und m/40 CaCl_2 versetzt (= PTB-Ansatz), 2,5' bei 37° C inkubiert und dann auf TB gemessen. Der erhaltene Wert entspricht der Summe von PTB + TB. Daneben wird TB, wie oben beschrieben, gemessen. Zur Versuchszeit $T = I_0$ beispielsweise hat also folgendes zu geschehen: 0,2 ml des Inkubationsgemisches werden zum PTB-Ansatz gegeben, 2,5' bei 37° C inkubieren lassen, inzwischen weitere 0,2 ml des Inkubationsansatzes mit aqua bidest. 1:5 verdünnt (um auf die gleiche Konzentration des PTB-Ansatzes zu kommen) (= TB-Ansatz) und sofort die GZ gemessen (= TB-Gehalt). Nach 2,5' wird die GZ des PTB-Ansatzes gemessen (= Gehalt an PTB + TB). Erst nach Uben gelingt es, bei dieser etwas umständlichen Prozedur möglichst wenig Zeit zu verschwenden, und die einzelnen Handgriffe exakt auszuführen. Die einzelnen Gläser, Röhrchen und sonstigen Hilfsmittel müssen mit peinlicher Sorgfalt gereinigt, getrocknet und aufbewahrt werden, um die an sich schon sehr empfindlichen Reaktionen hinreichend genau ablaufen zu lassen.

c) Ausgangssubstanzen.

Als Ausgangssubstanzen wurden benötigt:

I. Gefriergetrocknetes Fibrinogen (= F'gen) in 300 mg % Lösung.

Die Lösung wird mit Trispuffer von pH 7,5 Nr. II täglich frisch hergestellt.

2. Gefriergetrocknetes Rinderprothrombin (= PTB), hergestellt nach der Harvard-Methode, je nach Präparat in wechselnder Konzentration, (1 - 20 mg %). Die Lösung muss mit aqua bidest. täglich frisch hergestellt werden.
3. Säurebehandeltes PTB (= HCl - PTB):
2 ml 100 mg % PTB + 2 ml n/10 HCl, 10' einwirken lassen, dann mit 2 ml n/10 NaOH neutralisieren und pH einstellen.
4. Trypsin, 10x/ml, muss täglich frisch in aqua bidest. gelöst werden.
5. Trombokinase "Behringwerke" (=TK) in 200 mg % - Lösung: 15' bei 37° C inkubieren lassen, dann 3' bei 1500 bis 2000 U/min. abzentrifugieren. Die Lösung in aqua bidest. muss täglich frisch zubereitet werden.
6. CaCl_2 sowie andere Salze werden in entsprechender Konzentration als chem. reine Salze in aqua bidest. gelöst.
7. Streptokinase (= SK) wird frisch in aqua bidest. gelöst.
8. Titriplex wird in 1000 mM-Lösung in aqua bidest. aufbewahrt und je nach Bedarf entsprechend verdünnt.
9. Gefriergetrockneter Faktor V (= V) wird aus 200 mg %-Stammlösung zum Messen stets frisch 1:4 mit Trispuffer verdünnt.

10. Sammelserum (= SS) enthält PTB, V, VII, und X, soll möglichst frisch sein und muss täglich frisch mit Trispuffer 1:10 verdünnt werden.

II. Trispuffer:

a.) 130 ml 2,43 % - Trislösung, 9 - 10 ml n HCl, pH 7,5 einstellen, auf 500 ml mit aqua bidest. auffüllen.

b.) 25 ml 2,43 % - Trislösung + 6 ml n/10 HCl + H₂O ad 100, pH 9,0 einstellen.

12. Kollidinpuffer: 25 ml 2,64 % - Kollidinlösung + 44 ml n/10 HCl + H₂O ad 100, pH 6,0 einstellen.

2. Ergebnisse

I. Problem:

Lassen sich Ca⁺⁺ - Ionen durch andere Ionen ersetzen?

Als erstes Problem sollte untersucht werden, wie die Konzentration verschiedener Ionen die Umwandlung von PTB in TB durch Trypsin beeinflusst. Dabei wurden folgende Ionen als Chloride geprüft:

- 1.) Ca⁺⁺-Ionen in 3-, 15-, 75-, 125-, 250- mM/l Endkonzentration
- 2.) Mn⁺⁺-Ionen in der selben Weise
3.) Na⁺, Mg⁺⁺, Sr⁺⁺, Cs⁺⁺ - und NH₄⁺-Ionen nur in Endkonzentrationen von 125 mM/l und 250 mM/l.

a. Optimale Ca^{++} - Konzentration

Zunächst wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Ca^{++} studiert (Abb.I). Mit der Konzentration des Ca^{++} steigt die TB-Ausbeute bis zur Ca^{++} -Endkonzentration von 75 mM/l. Höhere Konzentrationen hemmen. Die Startgeschwindigkeit der Reaktion wird in dem ganzen Bereich von der Ca^{++} -Konzentration nur wenig beeinflusst.

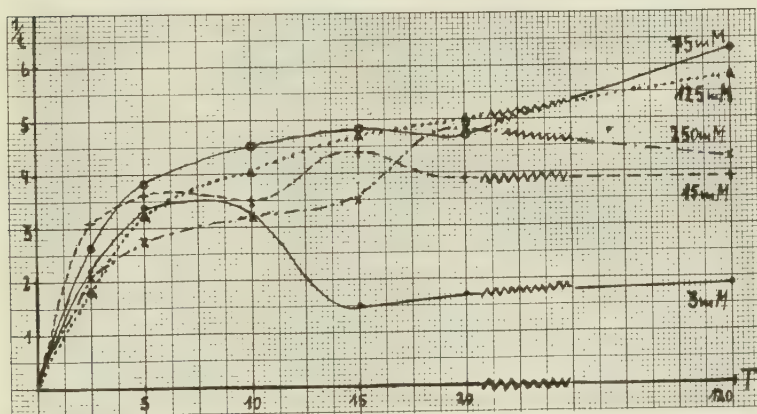


Abb. I: Der Einfluss von Ca^{++} -Ionen verschiedener Konzentration auf die Umwandlung von PTB in TB durch Trypsin.

Abb. 2 zeigt, dass die Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen bei der Umwandlung von PTB in TB notwendig ist. Io' lang läuft die normale Versuchsanordnung mit der optimalen Konzentration von

75 mM/l ab. Dann werden 0,6 ml 60 mM Titriplex zugegeben, um das Ca^{++} im Ansatz komplex zu binden. Es wird kein weiteres TB gebildet. Das in den ersten 10' gebildete TB wird dadurch verdünnt und zeigt dabei geringere Aktivität. Die Verdünnung wurde aber in der graphischen Darstellung auf das richtige Niveau korrigiert. Nach insgesamt 40' werden nun abermals 0,8 ml 300 mM CaCl_2 zugefügt, wonach die TB-Bildung wieder sprunghaft ansteigt. Analog dazu habe ich bei einem Kontrollversuch statt CaCl_2 Trispuffer verwandt. Ergebnis: keine TB-Bildung. Gibt man dann nach z.B. $T = 30'$ eine CaCl_2 -Lösung hinzu, so setzt sofort die TB-Bildung ein.

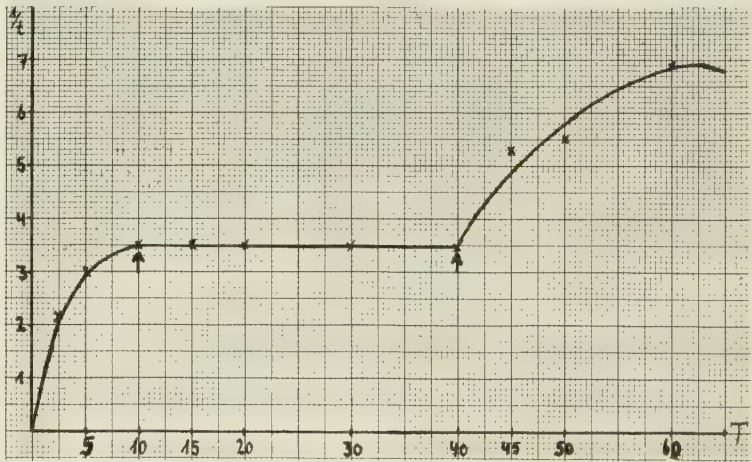


Abb. 2: Hemmung der TB - Bildung durch Titriplex

b. Mn^{++} - Ionen

Mn^{++} kann Ca^{++} ersetzen, ist jedoch weniger wirksam. (Abb. 3)
 Zum Unterschied von Ca^{++} ist hier die Anfangsgeschwindigkeit sehr deutlich von der Konzentration abhängig. Höhere Konzentrationen als 75 mM/l hemmen nicht wie bei Ca^{++} .

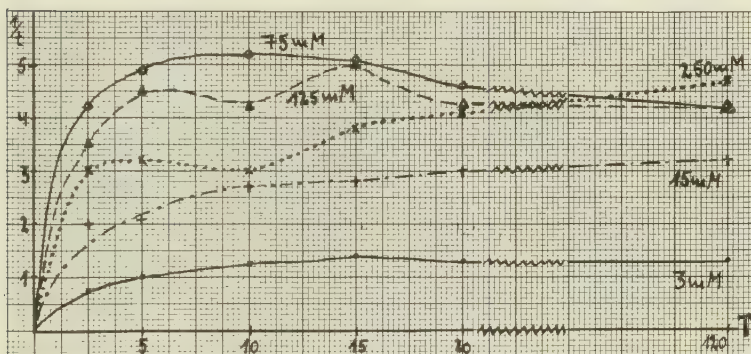


Abb. 3: Der gleiche Versuch wie in Abb. I, nur mit Mn^{++} statt mit Ca^{++} -Ionen.

c. Mg^{++} -, Sr^{++} -, Cs^{++} -, Na^{+} - und NH_4^{+} -Ionen

MgCl_2 ist aktiv (Abb. 4), wenn auch schwächer als MnCl_2 . Bei höherer Konzentration steigt die Startgeschwindigkeit sowie Ausbeute deutlich an. Bei den gemessenen Konzentrationen ist

auch nach langer Inkubationszeit nur ein geringer Aktivitätsabfall zu messen.

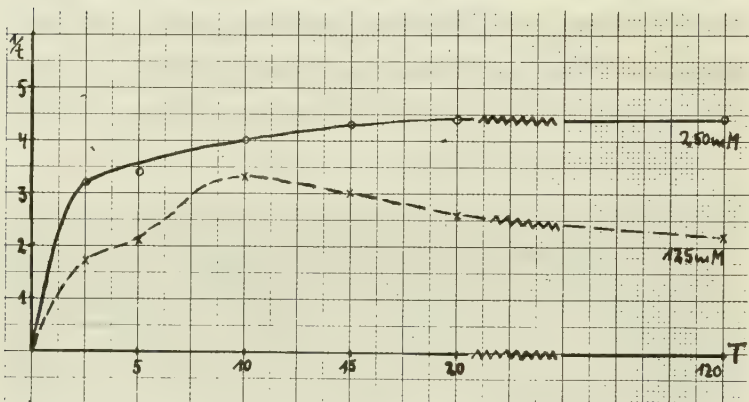


Abb. 4: $MgCl_2$

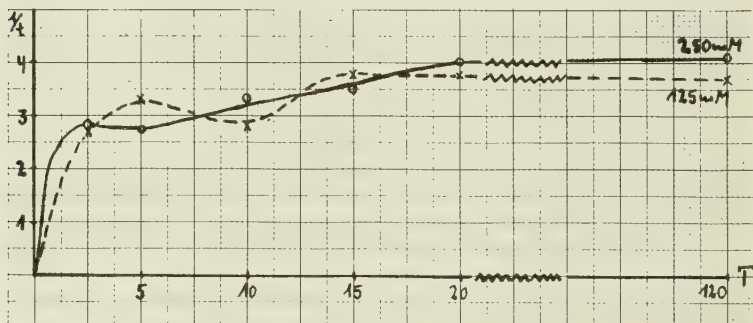


Abb. 5: $SrCl_2$

Mit SrCl₂ (Abb. 5) wird etwa soviel TB gebildet wie mit MgCl₂. Jedoch hängt die Reaktionsgeschwindigkeit, im Gegensatz zu Mg⁺⁺ und ähnlich wie bei Ca⁺⁺, nicht von der Konzentration ab. Zwischen der 125- und 250 mM - Lösung besteht keine Aktivitätsdifferenz.

CsCl₂ ist nur wenig aktiv (Abb. 6), wobei zwischen der 125- und 250 mM - Lösung kein Unterschied besteht.

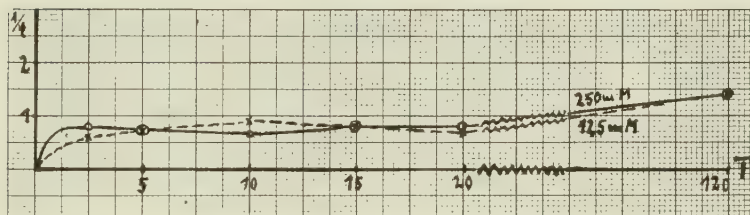


Abb. 6: CsCl₂

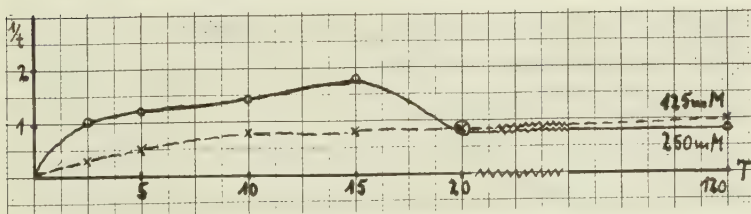


Abb. 7: NaCl

Auch NaCl hat eine viel schwächere Wirkung als MnCl_2 und CaCl_2 (Abb. 7). Die 250 mM - Lösung ist die wirksamste der geprüften und die optimale Konzentration scheint noch erheblich höher zu liegen.

NH_4Cl entfaltet nach langsamem Anstieg ebenfalls eine nur sehr geringe Aktivität. (Abb. 8)

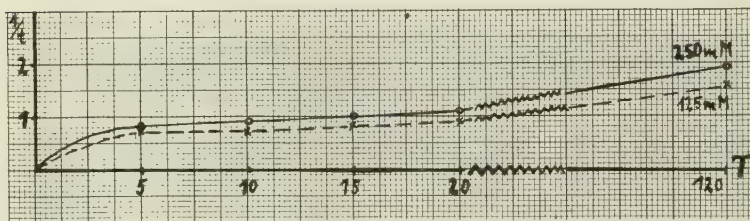


Abb. 8: NH_4Cl

Die gesamte Versuchsreihe über den Einfluss verschiedener Ionen auf die Umwandlung von PTB in TB wurde in einer Gesamt-Übersicht (Abb. 9) unter zwei Gesichtspunkten dargestellt:

In Abb. 9a ist die Menge des nach 2,5 Min. gebildeten TB in Abhängigkeit von der Konzentration der einzelnen Ionen aufgezeichnet. Das könnte man als "Startgeschwindigkeit" der einzelnen Reaktionen bezeichnen. Man kann hierbei mehrere Gruppen von Ionen unterteilen: Bei Sr^{++} , Cs^{++} und NH_4^+ ändert sich die Startgeschwindigkeit bei verschiedenen Konzentrationen kaum, bei Ca^{++}

nur bei den niedrigen Konzentrationen. Bei Mn^{++} , Mg^{++} und Na^{+} steigt die Startgeschwindigkeit mit der Konzentration an.

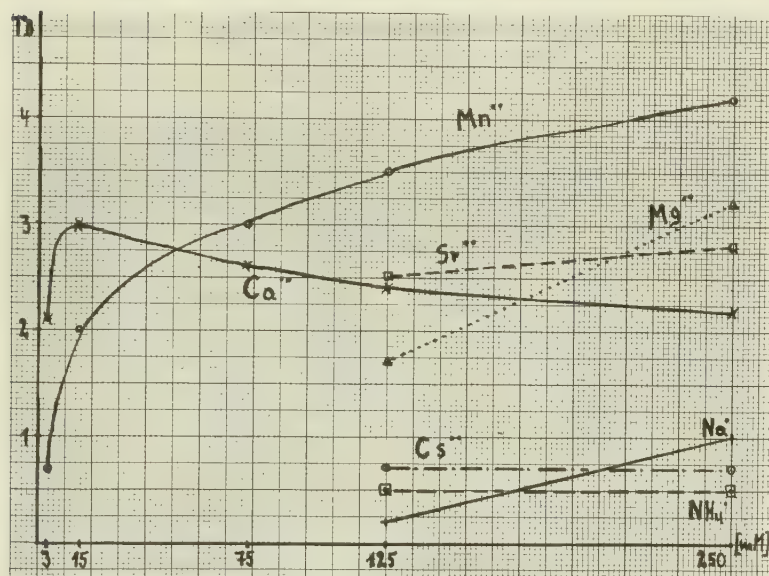


Abb. 9a: Menge des gebildeten TB nach $T = 2,5'$

Aus Abb. 9b ist die "Ausbeute" der einzelnen Experimente abzulesen, d.h. die nach 120 Min. gebildete Menge TB. Sehr anschaulich lässt sich die gestaffelte Wirksamkeit der Ionen erkennen, unter denen Ca^{++} weitaus an der Spitze liegt. Für Ca^{++} hemmen die Konzentrationen 125- u. 250 mM. Die optimale

Ausbeute liegt bei 75 mM. Für Mn^{++} , Sr^{++} , und Cs^{++} ist die Konzentration von 125 mM schon voll ausreichend. Höhere Konzentrationen sind ohne zusagenden Effekt. Bei Na^{+} und NH_4^{+} ist noch eine geringe, für Mg^{++} noch eine deutliche Steigerung der Ausbeute bei einer Konzentration von 250 mM zu erkennen.

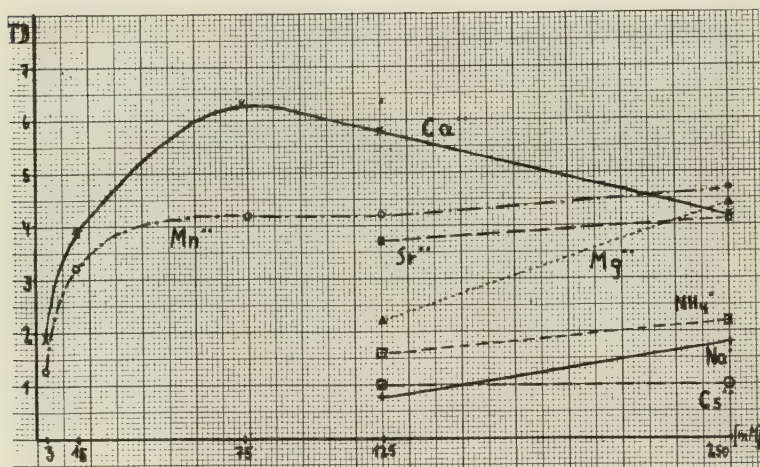


Abb. 9b: Menge des gebildeten TB nach $T = 120'$

II. Problem: Zwischenprodukt

a. Möglichkeiten

Zur Beantwortung der Frage, ob beim Umbau von PTB in TB ein Zwischenprodukt entsteht, wird neben TB noch die Summe von (PTB + TB) gemessen. Der Quotient $\frac{I}{GZ} = \frac{I}{t}$ dient als Mass

sowohl für die Summe von $(PTB + TB)$, als auch für TB . Lediglich die Ansätze, in denen die GZ gemessen wird, unterscheiden sich. Durch den Nachweis von TB einerseits und $(PTB + TB)$ andererseits (PTB -Ansatz) ergeben sich theoretisch mehrere Möglichkeiten (Abb. Io), nämlich:

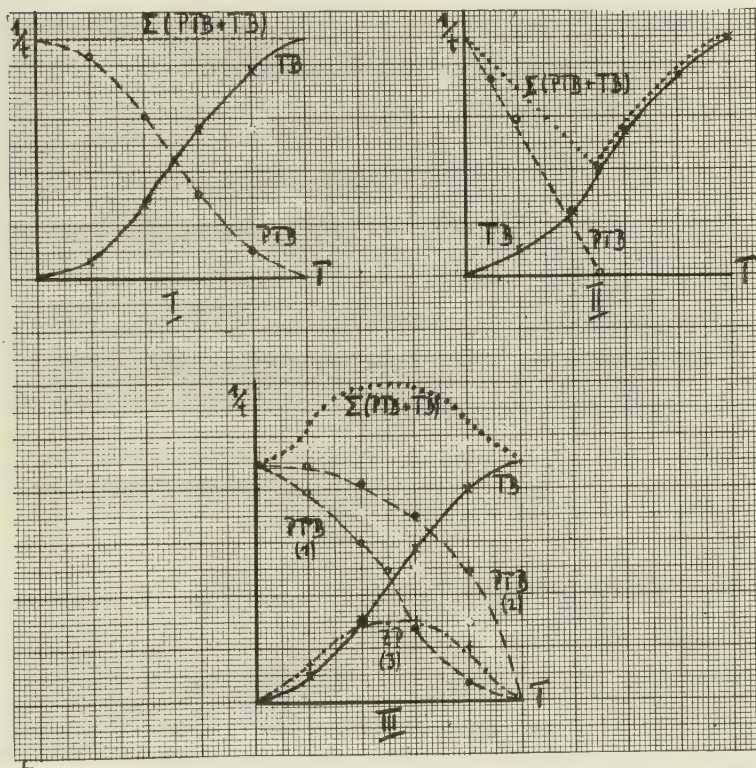


Abb. Io: Die drei Möglichkeiten, bei der Umwandlung von PTB in TB .

- I. Die Summe von (PTB + TB) bleibt konstant (PTB-Ansatz), während TB zunimmt (TB-Ansatz), es wird also kein Zwischenprodukt gebildet (Abb. Io, I). (Die PTB-Kurve wurde graphisch ermittelt durch Differenz von (PTB + TB) minus TB).
- II. Die Summe von (PTB + TB) nimmt ab, während TB wie bei I zunimmt, was bedeuten würde, dass PTB schon verschwunden ist, wenn erst die Hälfte des TB nachweisbar ist. PTB könnte daher zum Teil in ein Zwischenprodukt übergegangen sein, das inaktiv ist. (Abb. Io, II)
- III. Die Summe von (PTB + TB) nimmt zu, während TB wie bei I entsteht, so dass wir entweder annehmen müssen, TB entsteht, obwohl PTB noch nicht nachweisbar verschwindet (Kurve 2), oder PTB (Kurve I) wird zunächst zu einem Zwischenprodukt mit gesteigerter Aktivität umgebaut (Kurve 3).

b. Nachweis

Meine Messungen ergaben, dass bei der Reaktion PTB + Trypsin die Summe von (PTB + TB) zunimmt (Abb. II). Die graphische Darstellung der gefundenen Werte entspricht dem 3. Modell aus Abb. Io. Das spricht dafür, dass bei der Umwandlung von PTB in TB durch Einwirken von Trypsin das PTB zunächst in eine Zwischensubstanz übergeführt wird, die dann in TB übergeht, wie das Seegers bereits bei seinen Versuchen mit 25 % - Citrat-Lösung gefunden hatte.

Ermittelt man die Differenz zwischen den jeweiligen Messwerten von (PTB + TB) und dem maximal gebildeten TB, bzw. dem eingesetzten PTB, so ergibt sich die ZP-Menge (Abb. II).

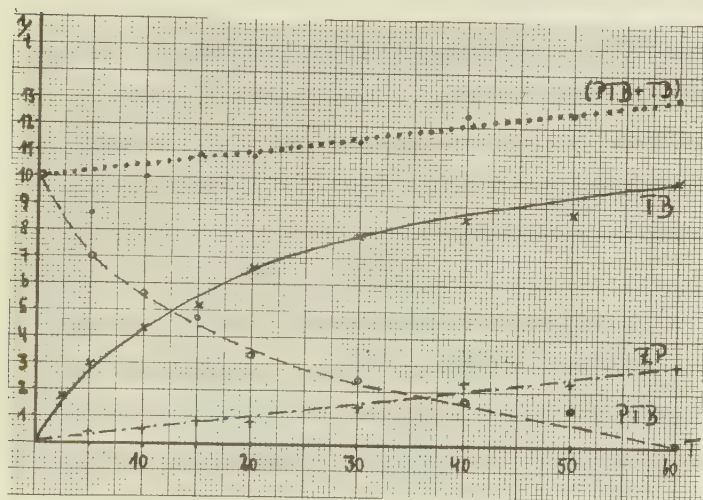


Abb. II: Umwandlung von PTB in TB über ein ZP.

c. Befunde

Dieses Zwischenprodukt besitzt noch "PTB"-Aktivität, nicht dagegen TB-Aktivität. Unter den Standardbedingungen scheint dieses Produkt neben TB zu entstehen, d.h. die Umwandlung durch Trypsin liefert zwei verschiedene Produkte, TB und ZP nebeneinander.

Die Annahme eines Zwischenproduktes bedeutet für die Auswertung unserer Versuchsergebnisse, dass dessen Menge der Differenz zwischen (PTB + TB) einerseits, und eingesetztem PTB bzw. maximal gebildetem TB andererseits entspricht. Daraus ergibt sich aber auch gleichzeitig, dass man aus dem Messwert (PTB+TB) nach Subtraktion des TB nicht einfach das betreffende PTB erhält, sondern dass dieser Wert, den wir zunächst einmal als "PTB" bezeichnen wollen, auch noch das gesuchte ZP enthält. Den wahren PTB-Wert erhalten wir also erst, nachdem wir das ZP von "PTB" subtrahiert haben.

Bei der von uns benutzten Versuchsanordnung war es natürlich unmöglich, auch nur annähernd genaue Werte zu erhalten; das war auch nicht beabsichtigt, sondern es sollten lediglich unter möglichst gleichen Bedingungen in Grössenordnung und Verlauf vergleichbare Kurven gefunden werden. Bei der Empfindlichkeit der Ausgangssubstanzen mussten daher trotz umfangreicher Testversuche und Wiederholung mehrerer Experimente gewisse Schwankungen in Kauf genommen werden. Besondere Schwierigkeiten bereiteten die Messungen bei $T = 0$ Minuten, die natürlich nicht "trägheitslos" durchgeführt werden konnten. Da aber manche Reaktionen explosionsartig beginnen, mussten deshalb die $T = 0'$ -Werte für TB und (PTB + TB) oft korrigiert werden. Dies ist wichtig, weil von dem Startwert des eingesetzten PTB die Berechnung der ZP-Werte abhängt. Zur exakten Zeit $T = 0'$ ist aber weder TB noch ZP entstanden, während

alles PTB noch vorhanden ist, sodass der korrigierte $T = 0'$ -Messwert von (PTB + TB) als Grundlage für die Ermittlung der ZP-Kurve dienen kann.

Wenn wir uns nochmals die Kurven der Abb. II ansehen, dann erkennen wir deutlich, dass in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen und unter optimalen Bedingungen die gebildete TB-Menge der verschwundenen PTB-Menge parallel geht. Diese Reaktion ist hier schon nach 60 Min. fast abgeschlossen. Das entstehende ZP nimmt bis zu diesem Punkt linear zu und erreicht knapp $1/3$ der eingesetzten PTB-, bzw. der gebildeten TB-Menge.

Es sollte dann geprüft werden, ob sich das Verhältnis zwischen gebildetem TB und ZP durch Änderung der Reaktionsbedingungen beeinflussen lässt.

d. Abhängigkeit des ZP von der Trypsinkonzentration

Zunächst prüfen wir den Einfluss verschiedener Trypsinkonzentrationen. Abb. I2 zeigt, dass die Bildung von ZP und TB bei Einsatz von 10 γ ebenso gross ist wie bei Einsatz von 20 γ . Bei höherer Trypsin-Konzentration verlaufen lediglich die TB-Bildung und PTB-Abnahme rascher.

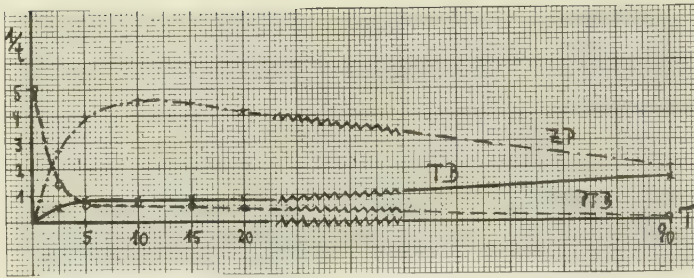


Abb. I2a: Umwandlung von PTB in TB durch Trypsin 10 γ /ml

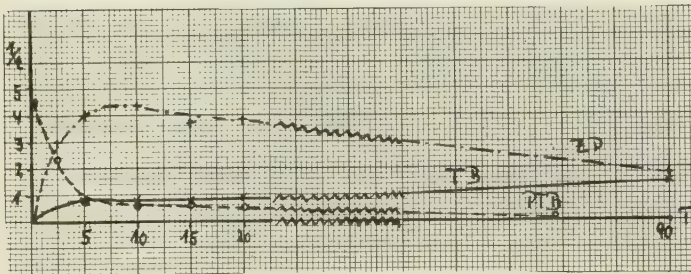


Abb. I2b: Derselbe Ansatz, jedoch mit einer Trypsin-Konzentration von 20 γ /ml

Vorbehandlung des PTB

Um festzustellen, ob dieses ZP möglicherweise aus einer Beimischung des verwandten PTB-Präparates stammte, wurde das PTB durch Säure vorbehandelt, um Verunreinigungen (z.B. Faktor V) zu beseitigen (Abb. I3). Ein solches Faktor V - freies PTB wird durch Trypsin sehr rasch umgebaut und liefert sogar noch mehr

Zwischenprodukt. Dabei entstehen TB und ZP gleichzeitig nebeneinander. Wenn alles PTB verbraucht ist, wird ZP weiter abgebaut, während die TB-Bildung weitergeht.

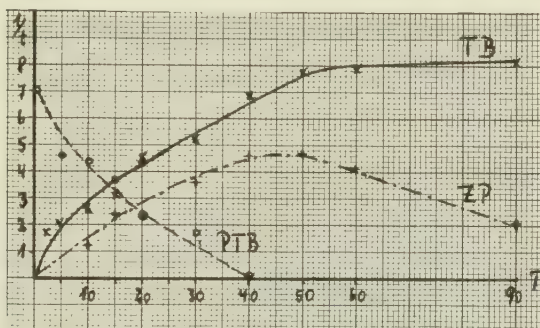


Abb. 13: Vorbehandlung des PTB mit Säure und Alkali

Zusatz von Streptokinase

Im nächsten Versuch haben wir dem Ansatz 20.000 I.E. Streptokinase hinzugefügt (Abb. 14), mit dem Ergebnis, dass das PTB sehr rasch ab- und das TB noch rascher zunimmt. Diese Reaktion hat also gewissermassen einen explosionsartigen Start, um dann viel langsamer weiterzulaufen. Das ZP wird hier langsamer als in Abb. 13, aber ebenfalls in grösserer Menge gebildet als unter Standardbedingungen. Und hier fällt noch etwas Besonderes auf, was schon im vorigen Versuch zu beobachten war: das ZP wird in einem Umfang gebildet, der 70 - 80 % der eingesetzten PTB-Menge entspricht, und es sieht fast so aus, als ob das ZP

desto aktiver ist, je mehr die Aktivität des PTB von Anfang an reduziert wurde. Möglicherweise handelt es sich bei dem ZP um eine Substanz, die im PTB-Präparat bereits vorhanden ist und von Trypsin "aktiviert" wird, während PTB verschwindet. Dafür spräche vielleicht auch der bemerkenswerte Befund, dass besonders im Versuch der Abb. I4 das TB in den ersten 10 Min. zum grössten Teil direkt aus dem verschwindenden PTB entsteht, und dann, sobald die eingesetzte PTB-Menge verbraucht ist, aus dem ZP weiteres TB gebildet wird.

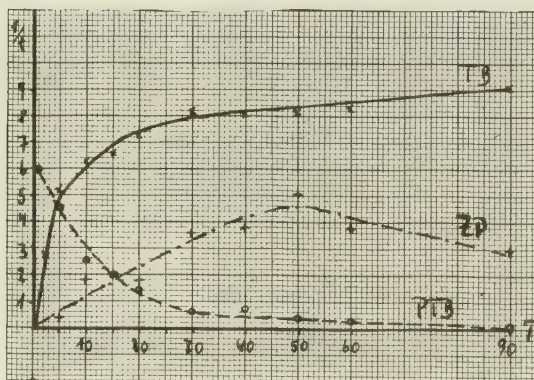


Abb. I4: Verwendung von Streptokinase

Der Einfluss des pH - Wertes

Auch der pH-Wert wurde variiert, in der Erwartung, dass dies einen Einfluss auf die Bildung des ZP hätte. Im sauren Milieu

von pH 6,0 war dies auch der Fall (Abb. 15a). Das PTB. ver-
 schwindet langsam, das TB wird in entsprechender Menge, zu-
 nächst relativ schnell, dann langsamer aus dem ZP gebildet.
 Interessant ist, dass die ZP-Menge, ähnlich wie in Abb. 13,
 bereits nach etwa 40 Min. ihren Maximalwert erreicht. Ins-
 gesamt sind jedoch sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit, als
 auch die Ausbeuten im sauren Milieu deutlich reduziert.

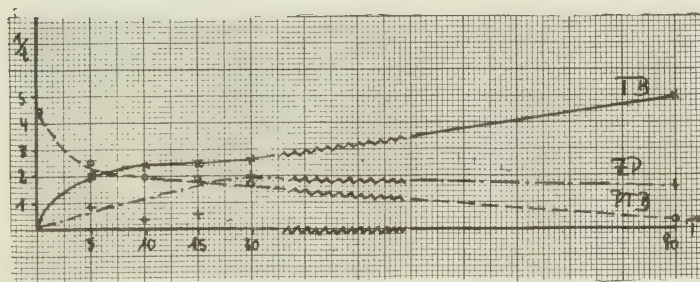


Abb. 15a: Saures Milieu von pH 6,0

Anders ist das im alkalischen Milieu bei pH 9,0 (Abb. 15b).
 Der Reaktionsverlauf entspricht fast dem "normalen" in
 Abb. II, wobei das Tempo des Reaktionsablaufes und die
 Mengenverhältnisse von ZP und TB nur geringfügig niedri-
 ger liegen.

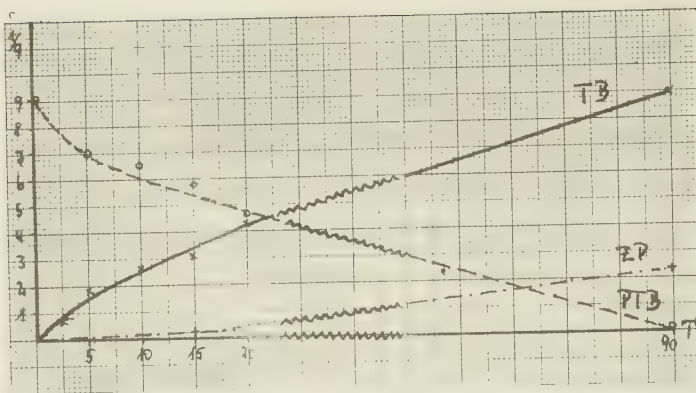


Abb. 15b: Alkalisches Milieu von pH 9,0

Lassen sich Ca^{++} - Ionen durch andere Ionen ersetzen?

Die Umwandlung von PTB über ein ZP in TB mittels Trypsin geschah bei den bisherigen Versuchen stets in Gegenwart von Ca^{++} - Ionen in einer End-Konzentration von 3 - 12 mM/l, meistens 6 mM/l. Läuft diese Reaktion auch in Gegenwart anderer Ionen ab und welche Konzentration ist ggf. dazu erforderlich?

Im Versuch der Abb. 16 wurde statt CaCl_2 NaCl in 150 mM/l End-Konzentration verwandt. Zwar geht die PTB-Abnahme der TB-Zunahme etwa parallel, doch es gelingt nicht, das PTB völlig abzubauen, sondern es bleibt ein Rest bestehen. Ebensov wenig erreicht das gebildete TB die eingesetzte PTB-Menge. Dieses Defizit entspricht etwa dem ZP, dessen Bildung sistiert und

praktisch auf diesem Punkt stehen bleibt.

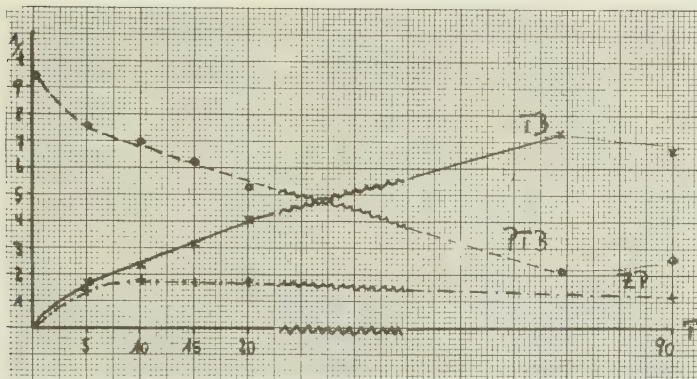


Abb. 16: Statt Ca^{++} - Ionen wurden Na^{+} - Ionen eingesetzt
(150 mM/l)

Bei den folgenden Versuchen wurden den Ansätzen die Salze jeweils in 6 mM- und 60 mM-Lösung zugefügt. In Abb. 17a nimmt das PTB in Gegenwart von 6 mM NH_4Cl nur wenig ab, und es entsteht auch nur wenig TB. Trotzdem sehen wir eine rasche Bildung des ZP, dessen Menge sogar die des eingesetzten PTB übersteigt. Woran liegt das? Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich dafür keine eindeutige Erklärung finden. Jedenfalls ist man geneigt, das ZP eher als relativ selbstständiges Nebenprodukt zu bezeichnen. Bei höherer Konzentration ändert sich diese Lage bedeutend (Abb. 17b). Das PTB wird völlig umgewandelt, und zwar schon binnen 60 Min. Korrespondierend dazu entsteht

das TB, aber merkwürdigerweise deckt sich dessen Kurve weitgehend mit der des ZP. Wenn wir die Abb. I7 mit den Abb. I3 und I4 vergleichen, sehen wir erneut: bei langsamem Umbau von PTB wird relativ viel ZP gebildet, aus dem in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen allmählich, z.T. sogar über die eingesetzte PTB-Menge hinaus, TB "freigesetzt" wird. Bei katalytisch weniger aktiven Ionen wie das NH_4Cl bleibt das ZP zum grossen Teil erhalten und wird nicht weiter zu TB umgebaut.

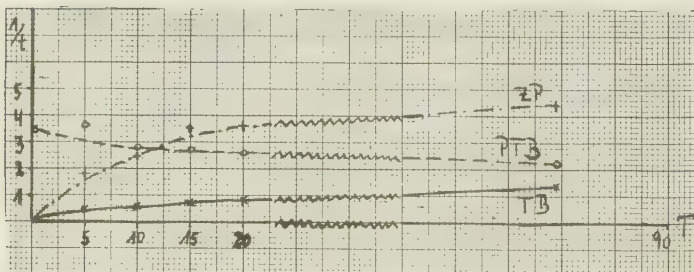


Abb. I7a: 6 mM NH_4Cl

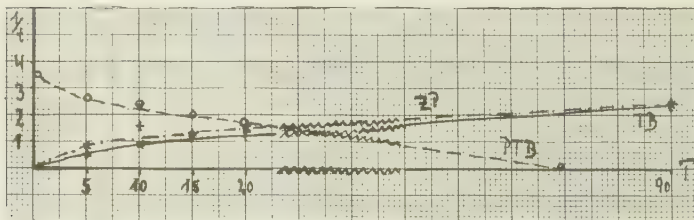


Abb. I7b: 60 mM NH_4Cl

Mg^{**} -Ionen in einer Konzentration von 60 mM/l führen zu langsamem PTB-Abbau und geringer TB-Bildung (Abb. I8). Die Bildung des ZP setzt verzögert ein und erreicht fast die Ausbeute des TB. Das ZP bleibt als selbständiges Nebenprodukt auch hier, ähnlich wie bei NH_4Cl , erhalten. Die Reaktion mit einer 60 mM SrCl_2 -Lösung verläuft etwa in gleicher Weise.

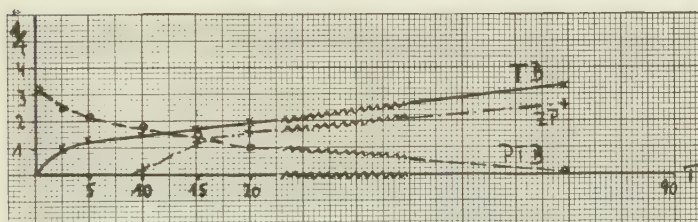


Abb. I8: 60 mM MgCl_2

Abb. I9a zeigt den Einfluss einer 6 mM CsCl_2 -Lösung.

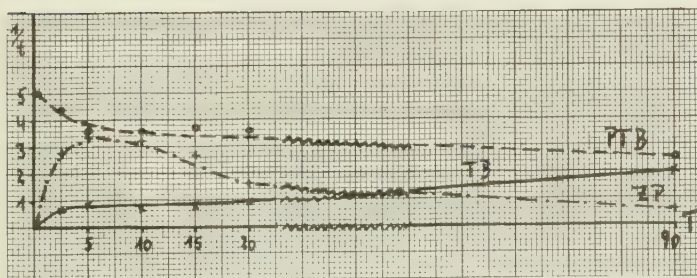


Abb. I9a: 6 mM CsCl_2

Aus PTB, das langsam und nur wenig abnimmt, entsteht sogar hauptsächlich ZP, ähnlich wie bei NH_4Cl , während nur wenig TB gebildet wird. Das zu Beginn der Reaktion fast explosionsartig entstandene ZP wird allerdings, anders als bei NH_4Cl , langsam, wenn auch unvollständig, in TB umgewandelt.

In Abb. I9b wird das PTB in Gegenwart einer 60 mM CsCl_2 -Lösung in 60 Min. abgebaut, wobei zunächst viel ZP entsteht, das allmählich in TB überführt wird, und zwar in einer Menge, die dem eingesetzten PTB entspricht.

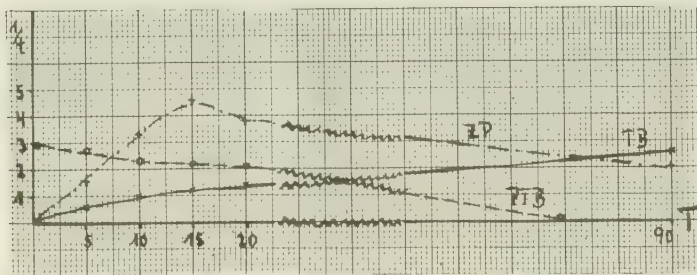


Abb. I9b: 60 mM CsCl_2

C. Besprechung und Zusammenfassung

der gefundenen Ergebnisse

Abschliessend sollen die Probleme und Versuchsergebnisse dieser Arbeit noch einmal kurz zusammengefasst werden:

Zunächst sollte geklärt werden, in welcher Weise die TB-Bildung von Art und Konzentration verschiedener Ionen abhängt. Ich kam zu dem Ergebnis, dass es katalytisch stark (Ca^{++} und Mn^{++}) und schwach-wirksame Ionen gibt (Cs^{++} , Na^+ , NH_4^+), während Sr^{++} - und Mg^{++} -Ionen in ihrer katalytischen Wirksamkeit zwischen diesen beiden Gruppen liegen. Ich fand ausserdem, dass es für die einzelnen Ionen jeweils eine optimale Konzentration gibt, die ein Maximum an TB zu bilden vermag. Die Ca^{++} -Ionen erwiesen sich sowohl bezüglich ihrer maximalen TB-Bildung, als auch in Bezug auf ihre optimale Konzentration als weitaus am wirksamsten.

Als zweites Problem sollte untersucht werden, ob bei der Umwandlung von PTB in TB durch Trypsin in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen das PTB zunächst in ein Zwischenprodukt und von diesem erst in TB übergeführt wird, wie das Seegers bereits bei der Umsetzung mit 25 % - Citrat gefunden hatte. Ich kam zu dem Ergebnis, dass auch bei meiner Versuchsanordnung ein ZP nachweisbar ist, das weiter zu TB umgebaut werden kann, wie aus den mitgeteilten Befunden hinreichend zu ersehen ist. Wieviel ZP entsteht, hängt von mehreren Faktoren ab: unter Standardbedingungen entstehen aus PTB TB und ZP nebeneinander. Dabei ist die TB-Ausbeute über dreimal grösser als die Ausbeute an ZP. Ein mit Säure und Alkali gereinigtes PTB liefert sogar

noch mehr ZP. Auch bei pH 6,0 und in Gegenwart von Streptokinase wird ein grösserer Anteil des PTB in ZP umgewandelt als unter Standardbedingungen und bei pH 9,0. Werden die Ca^{++} -Ionen durch Cs^{++} - oder NH_4^+ -Ionen ersetzt, so entsteht aus PTB sogar hauptsächlich ZP, während nur sehr wenig TB gebildet wird. Bei NH_4^+ bleibt dieses ZP erhalten, während es bei Cs^{++} nachträglich in TB überführt wird.

Verzeichnis der Hochschullehrer, bei denen ich Vorlesungen gehört, bzw. an Praktika teilgenommen habe.

I. An der Universität zu Tübingen:

Die Herren Professoren: Bartels, Brecht, Feneis,
Hellmann, Hillmann, Knappwost, Krüger, Möhres, Mörike,
Mühleisen, Rebel, Weitzel;

Die Herren Oberärzte: Dr.Dr. Strack, Dr. Körber

2. An der Universität zu Frankfurt am Main:

Die Herren Professoren: Altmann, Artelt, Frey, Greeff,
Hauser, Jürgens, Kahlau, Kleinschmidt, Kühne, Kuck,
Luff, v.Reckow, Sandritter;

Die Herren Oberärzte: Dr.Dr. Kreter, Dr. Koller, Dr. Landes,
Dr. Rossberg.

Ehrenwörtliche Erklärung über die selbständige
Abfassung dieser Arbeit.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Der Ablauf der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin unter dem Einfluss verschiedener Faktoren" im Institut für vegetative Physiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Heinz mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. L. Róka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main, den 2. Jan. 1963

Wolfgang Glaser

Lebenslauf

Am 26. Mai 1937 wurde ich, Heinrich Wolfgang Glaser, als Sohn des Zahnarztes Dr. Heinz Glaser und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Klee, in Frankfurt am Main geboren. Nach dem Besuch der Volksschule bestand ich 1946 die Aufnahmeprüfung am humanistischen Heinrich-von-Gagern-Gymnasium in meiner Heimatstadt. An dieser Anstalt legte ich am 3. März 1956 die Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1956 wurde ich als Student der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen immatrikuliert, die ich nach bestandenen Physikum verliess. Zum Wintersemester 1958/59 liess ich mich an der hiesigen Johann-Wolfgang-Goethe-Universität einschreiben und schloss mein Studium am 30. Juni 1961 mit dem zahnmedizinischen Staatsexamen ab.

Da mein Vater im März 1961 starb, wird die Praxis von einem Vertreter geführt, bei dem ich seit erfolgter Bestallung als Assistent arbeite, bis ich mich selbständig niederlassen kann.

Ich wohne in Frankfurt/Main - Fechenheim, Konstanzer Str. 3.

Wolfgang Glaser

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- I.) L Róka: Kinetik der Prothrombin-Umwandlung aus
"Fourth International Congress of
Biochemistry, Vol. X - Blood-Clotting Factors"
- 2.) K.D. Miller u. H. van Vunakis: J. Bio.Chem. 223,227 (1956)
- 3a) W.H. Seegers, E.B. Andrews u. R.J. Mc Claughry:
Amer. J. Phys. 164, 722 (1951)
- b) W.H. Seegers, L. Lorand u. N. Alkjaersig:
Arch. Biochem. Biophys. Vol. 45 No. 2 (1953)
- c) W.H. Seegers: "Coagulation of the Blood, IV:
Prothrombin Activation" aus
"Advances in Encymology and Related
Subjects of Biochemistry" Vol. XVI (1955)
- d) W.H. Seegers: Archives of Biochemistry and Biophysics
61, I, (1956)
- 4.) H.E. Schultze u. G. Schwibck: Hoppe-Seyl. Z. 289, 26 (1951)

N a c h w o r t

Herrn Prof. Dr. L. Róka möchte ich an dieser Stelle
für die Überlassung des Themas und seine verständnisvolle
Unterstützung meiner Arbeit herzlich danken.

